LC/Triple Quadrupole 質量分析計による食品サンプル中の 100 種類の農薬の多成分一斉分析

アプリケーション

食品安全性

著者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman
Pesticide Residue Research Group
University of Almeria
Almeria, Spain

Yanyan Fang, Paul Zavitsanos, and Jerry A. Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
USA

要約

Agilent G6410AA 三連四重極型質量分析計 (QQQ) を使用して、野菜と果物サンプル中の 100 種類の農薬の存在を確認するための分析手法を開発しました。2 つの時間セグメントによる一回の分析で、1 農薬につき 1 MRMトランジションを設定しました。得られた感度は、食品分析プログラムに関する欧州連合(EU)規制で規定された残留基準 (MRL) を満足しました。この方法の分析性能の評価にはマトリックス効果を示さないか、少ししか示しませんでした。さまざまな種類の果物と野菜 (オレンジ、トマト、ピーマン)について、2 桁を超えるレスポンスの直線性が実証されました (r > 0.99)。この研究は、野菜や果物中農薬のルーチン的定量分析で用いる多成分一斉分析に対する QQQ の可能性を示すものです。

緒言

近年、消費品中の残留基準 (MRL) に関して規定された規制がますます厳しくなってきました。欧州連合 (EU) は、健康上の懸念をもたらす野菜中の低濃度農薬に対して新たな指令を設定しました。ベビーフード製造用の果物と野菜に対して、10 µg/kg の MRL がすべての農薬に適用され、残留基準の設定のない化合物にも 最も低い 10 µg/kg の残留基準があります。この低い残留基準が、複雑な試料で必要条件を満たすための、より高感度な分析法の開発を促しています。この意味で、文献で幅広く報告されているように、マルチプルリアクションモニタリング(MRM) モードによる三連四重極型液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (LC-MS-MS) が、今までのところ食品中の農薬の定量に最も幅広く使用される技術になってきました。一方、飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) のような高分解能質量分析手法は、スクリーニング目的に使用されています。それでもなお、低い検出下限や MS/MS 能力とを有する検出手法として、三連四重極は、そのその簡便さにより、規制当局公認ラボでのルーチン測定の手法としては非常に貴重であることは変わりありません。TOF-MS のような、より洗練された技術に必要な高度技術を持つ要員が不足している規制当局には、使いやすさは重要な要素です。モニタリング目的にその信頼性を検証する必要があり、その基本はすでにルーチ

ン分析のためによく制定されているという意味では、三連四重極技術は新しいものではありません。

この研究では、果物と野菜中の農薬の分析について新型 Agilent トリプル四重極分析装置を用いて検討を行いました。QQQ の感度は、食品中の農薬に関する規制で要求されるレベルを容易に満足します。

実験

試料調製

農薬標準試料は Dr. Ehrenstorfer (ドイツ Ausburg) から購入しました。個々の農薬保存液 (約 1,000 µg/mL) は、それぞれ個々の化合物の溶解度に応じて、アセトニトリルまたはメタノールで調製し、–18 ˚C で保存しました。これらの原液を、アセトニトリルと水で希釈することで測定用標準溶液を調製しました。

野菜試料は地元の市場から入手しました。「ブランクの」野菜と果物の抽出物を使用して、バリデーション目的にマトリックスマッチング標準試料を調製しました。この方法で、以前のアプリケーションで既に説明した QuEChERS メソッドを使用して、2 種類の野菜と 1 種類の果物 (ピーマン、トマト、オレンジ) を抽出しました [1]。野菜抽出物は、さまざまな濃度 (2 ～ 100 µg/kg の範囲) の標準試料の混合液を添加、その後 LC/MS/MS で分析しました。

LC/MS/MS 装置構成

LC 条件

カラム:	Agilent ZORBAX Eclipse® XDB C-8、4.6 mm x 150 mm、5 µm、(p/n 993967-906)。
カラム温度:	25 ˚C
移動相:	A = 0.1% ギ酸水溶液 B = アセトニトリル
流量:	0.6 mL/min
グラジエント:	0 分で B を 10% 5 分で B を 10% 30 分で B を 100%
注入量:	1 ～ 5 µL

MS 条件

モード:	Agilent G6410AA Triple Quadrupole マススペクトルを使用したポジティブ ESI
ネブライザ:	40 psig
乾燥ガス流量:	9 L/min
V キャピラリ:	4000 V
乾燥ガス温度:	350 ˚C
Q1 分解能:	ユニット
Q2 分解能:	ユニット
フラグメンタ電圧:	70 V
衝突エネルギー:	5 ～ 25 V
MRM:	表 1 のとおり各化合物に対して 1 推移
デュエルタイム:	15 msec

結果と考察

LC/MS/MS 条件の最適化

10 µg/mL の濃度レベルで数グループの測定対象化合物 (1 回のクロマトグラフ分析で約 10 種類の測定対象化合物) を注入することで 、各化合物に対する最適な MRM トランジションの予備実験を行いました。さまざまな衝突エネルギー (5、10、15、20、25 V) を研究対象の化合物に適応しました。最適エネルギーは、主要なプロダクトイオンでかつ、原則としてスペクトル中でプリカーサーイオンより 10% 以上異なったイオンに対して最高感度を与える値を選択しました。各対象化合物に対して、最も感度の高いプロダクトイオンを 1 つだけ選択ＭＲＭ用トランジションに選択しました。結果は表 1 のとおりです。

表 1　検査した各化合物に対する分析条件と検出限界 (LOD)

化合物名	リテンションタイム (分)	プロトン化分子 $[M+H]^+$	生成物イオン (*m/z*)	衝突エネルギー	LOD (pg)
セグメント 1					
シロマジン	2.7	167	125	20	10
チオサルタップ	2.7	312	232	10	90
カルタップ	3	150	105	15	10
チオシクラム	4.5	182	137	10	8
アルジカルブスルホキシド	6.4	207	89	5	9
カルベンダジム	6.6	192	160	15	5
チアベンダゾール	7.9	202	175	25	10
アルジカルブスルホン	10.8	223	148	5	50
ニテンピラム	11	271	225	10	7
ヒドロキシアトラジン	11.2	198	156	15	3
メソミル	11.5	163	88	5	4
デシソプロピルアトラジン	11.9	174	132	15	18
イマザピル	12.5	262	234	15	8
メタミトロン	13.9	203	175	15	8
フェヌロン	14.5	165	72	15	2
デエチルアトラジン	14.8	188	146	15	4
イミダクロプリド	14.8	256	209	10	7
ジメトエート	15.4	230	199	5	7
アセタミプリド	15.5	223	126	15	6
プロメトン	15.7	226	184	20	4
イルガロール代謝物	16	214	158	15	0.8
メチオカルブスルホン	16.4	258	122	5	6
ニコスルフロン	16.9	411	182	15	6
チアクロプリド	17	253	126	15	3
イマザリル	17.2	297	159	15	7
メベンダゾール	17.2	296	264	20	2
アルジカルブ	17.5	213	89	10	10
イマザキン	17.8	312	284	20	15
オキサジキシル	17.9	279	219	10	10
フルロキシピル	17.9	255	209	10	120
シマジン	18	202	132	15	5
モニュロン	18	199	72	10	2
レナシル	18.4	235	153	10	20
シアナジン	18.5	241	214	10	70
メトルカルブ	18.5	166	109	5	2
スピロキサミン	18.6	298	144	15	10
ジクロルボス	18.7	221	109	15	10
メトリブジン	18.9	215	187	15	5
クロロトルロン	19.4	213	72	15	3
プロメトリン	19.5	242	200	20	2
テルブトリン	19.5	242	186	15	1
カルボフラン	19.6	222	165	10	2
ベンダイオカルブ	19.7	224	167	5	2
セグメント 2					
スピノサド A	20	732	142	5	12
カルバリル	20.1	202	145	5	2
イルガロール 1051	20.3	254	198	15	0.1
アトラジン	20.3	216	174	15	0.3
メタラキシル	20.4	280	248	10	5
ジフェノクスウロン	20.4	287	123	15	5
イソプロツロン	20.4	207	72	15	1

表 1　検査した各化合物に対する分析条件と検出限界 (LOD) (続き)

化合物名	リテンションタイム (分)	プロトン化分子 $[M+H]^+$	生成物イオン (*m/z*)	衝突エネルギー	LOD (pg)
ベンスルタップ	20.5	432	290	15	6
ジウロン	20.5	233	72	15	5
スピノサド D	20.7	746	558	5	100
エチオフェンカルブ	20.7	226	107	5	5
ジメトモルフ異性体 1	21.3	388	301	20	11
プロパクロール	21.6	212	170	10	1
ジメトモルフ異性体 2	21.7	388	301	20	8
プロクロラズ	21.9	376	308	10	6
プロパニル	22.2	218	162	15	10
シプロコナゾール	22.5	292	70	10	6
メチオカルブ	22.6	226	169	5	15
テルブチラジン	22.7	230	174	15	0.3
ブロムコナゾール異性体 1	22.8	376	159	20	6
フェナミホス	23	304	217	15	0.7
メチダチオン	23	303	145	5	5
アゾキシストロビン	23.2	404	372	10	0.4
ホスメット	23.2	318	160	5	2
キャプタン	23.2	300	264	10	50
ジメテナミド	23.3	276	244	10	1
プロメカルブ	23.3	208	151	10	5
ブロムコナゾール異性体 2	23.7	376	159	20	6
モリネート	23.7	188	126	10	5
ジフルベンズロン	24.1	311	158	10	9
イプロジオン	24.6	330	245	10	8
プロピコナゾール異性体 1	24.7	342	159	20	5
マラチオン	24.8	331	127	5	5
プロピコナゾール異性体 2	24.9	342	159	20	5
メトラクロール	24.9	284	252	10	2
トリフルミゾール	24.9	346	278	10	7
アラクロール	25	270	238	10	8
アセトクロール	25.1	270	224	10	8
フルフェナセット	25.2	364	194	5	5
ジフェノコナゾール異性体 1	25.3	406	251	20	4
ジフェノコナゾール異性体 2	25.4	406	251	20	4
クロルフェンビンホス	25.5	359	155	10	8
ベナラキシル	25.8	326	294	5	5
パラチオンエチル	26.2	292	236	10	9
トリクロカルバン	26.4	315	162	15	8
ヘキサフルムロン	26.5	461	158	10	7
ブフロフェジン	26.7	306	201	10	1
ダイアジノン	26.8	305	169	15	1
テフルベンズロン	26.9	381	158	15	22
クロルピリホスメチル	27.1	322	212	15	15
プロフェノホス	27.6	373	303	10	7
ルフェヌロン	27.9	511	158	10	10
プロスルホカルブ	28	252	91	15	2
フルフェノクスロン	28.5	489	158	10	6
ブチレート	28.7	218	57	10	2
ペンジメタリン	29.2	282	212	5	5
トリフルラリン	29.7	336	236	15	30

MRM トランジションは分析条件の一部であり、各 MRM トランジションの Dwell time は 15 msec としました。また、1 分析に 2 個の時間セグメントを設定し、各セグメントには約半分の農薬を含んでいます 。図 1 には、検討したすべての化合物に対して、カラムへの絶対注入量として 100 pg に相当するクロマトグラムを示しています。このクロマトグランムは各農薬に対するプリカーサーイオンとプロダクトイオンから成る MRM トランジションによる抽出イオンクロマトグラムを重ね描きしています。

直線性と検出限界

カラムへの絶対注入量として 2 ～ 100 pg の範囲の 5 種類の異なる濃度レベルで標準溶液を分析して、直線性を評価しました。例として、アトラジンの検量線は図 2 のとおりです。この検量線から分かるように、検討した範囲全体にわたり直線性は、相関係数 0.998 と良好な結果でした。残りの農薬に対しても、同様の結果が得られました。

約 3 の S/N 比に相当する濃度レベルで標準溶液を注入することで、検出限界 (LOD) を推定しました。得られた結果も表 1 に含んでいます。トリアジンがもっとも検出限界が低く (カラムへの絶対注入量で 100 fg ～ 2 pg)、最も検出限界の高かった農薬はフルロキシピルとスピノサド D でした (約 100 pg)。

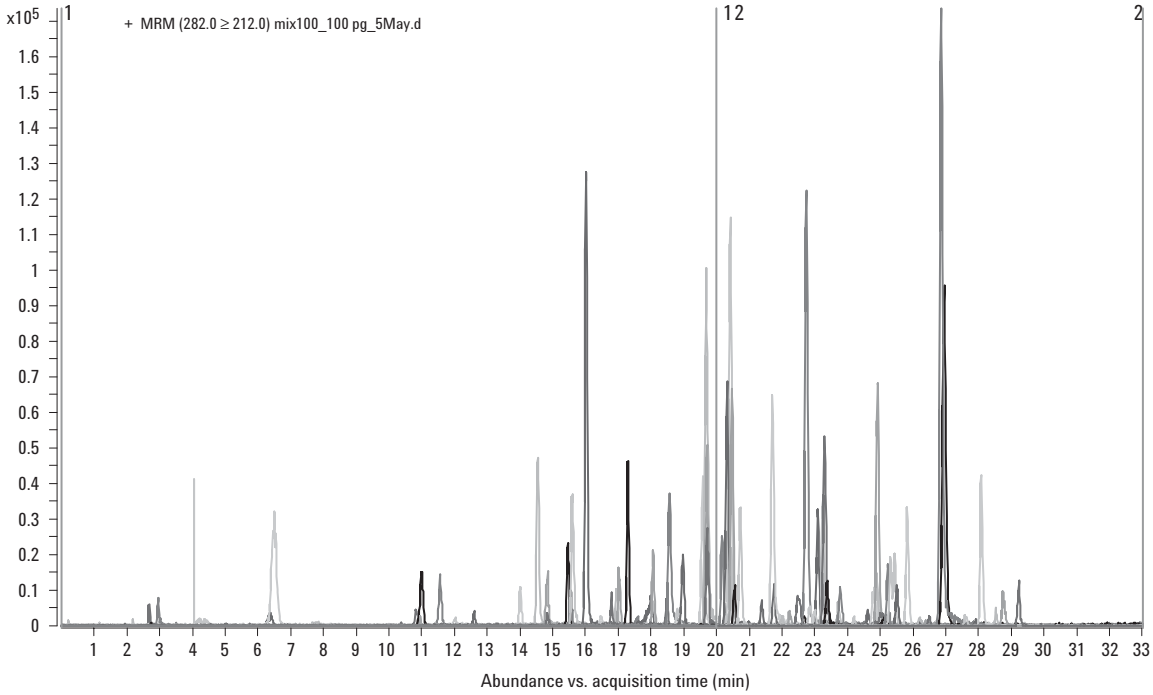

図 1　　100 種類の農薬混合物の生成物イオンクロマトグラム (濃度: カラム上で 100 pg)。

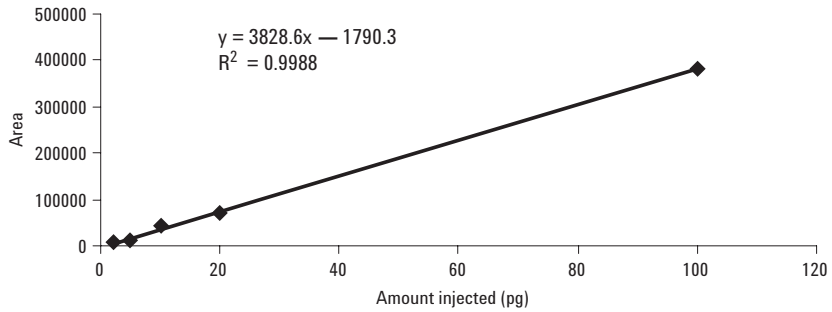

図 2　　重み付けと原点処理なしの直線近似を使用したアトラジンの検量線。

野菜マトリックスへの適用

実際の試料の分析に対する本分析法の適合性を確認するために、2 種類の異なる濃度レベル (10 および 100 µg/kg) で 3 種類の異なる試料 (ピーマン、トマト、オレンジ) を用いて標準液を添加して試料抽出液を分析しました。図 3 には、10 µg/kg (カラムへの絶対注入量で 10 pg) の農薬混合物を添加したピーマンの分析結果を示しています。２つの MRM クロマトグラムから分かるように、MRM モードの選択性が高いことから、複雑なマトリックスからでもジメトエートとアゾキシストロビンが容易に検出が可能であり、EU 指令の基準値を満たしています。一般的に、得られた LOD は既存の欧州規制で規定されている残留基準を満足しました。

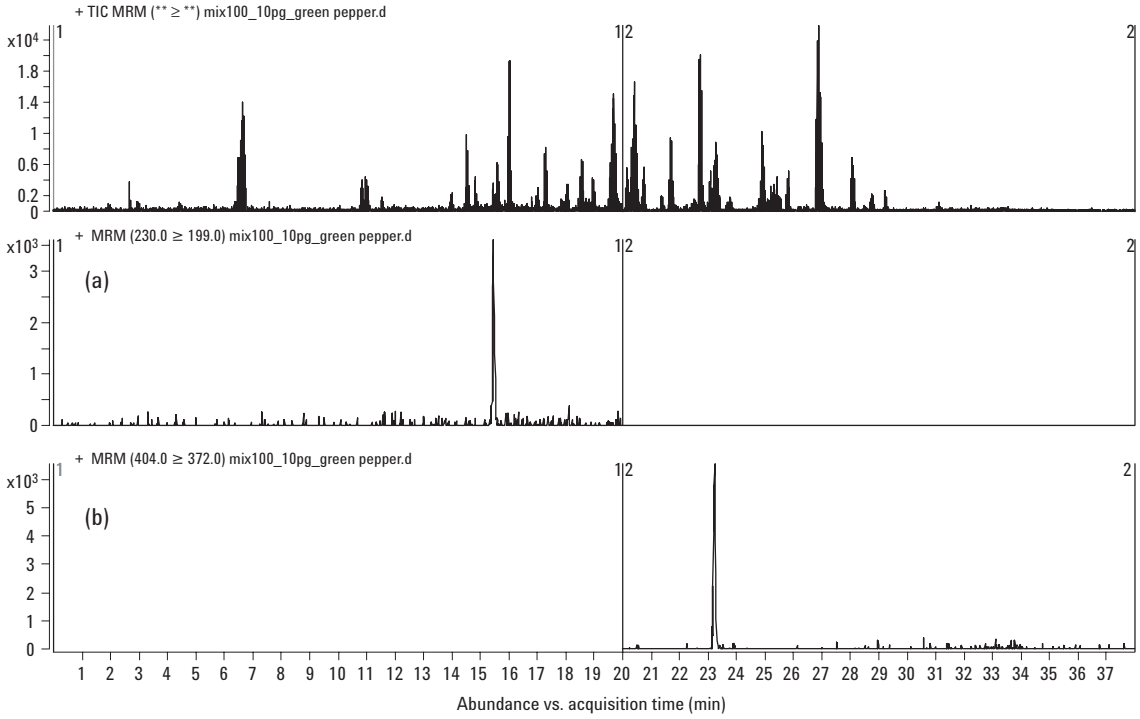
+ TIC MRM (** ≥ **) mix100_10pg_green pepper.d
+ MRM (230.0 ≥ 199.0) mix100_10pg_green pepper.d
(a)
+ MRM (404.0 ≥ 372.0) mix100_10pg_green pepper.d
(b)
Abundance vs. acquisition time (min)

図 3　10 µg/kg のスパイクされたピーマンサンプルの MRM クロマトグラム。(a) ジメトエートと (b) アゾキシストロビンの生成物イオンクロマトグラム

www.agilent.com/chem/jp

参考文献

1. Imma Ferrer and E. Michael Thurman, “Determination of Fungicides in Fruits and Vegetables by Time-of-Flight and Ion Trap LC/MS” (2005) Agilent Technologies, publication 5989-2209EN www.agilent.com/chem.

詳細情報

Agilent 製品とサービスの詳細については、Agilent のウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。
また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

本資料に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。
著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本資料を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies,Inc. 2006

Printed in Japan
August 9, 2006
5989-5469JAJP

Agilent Technologies